

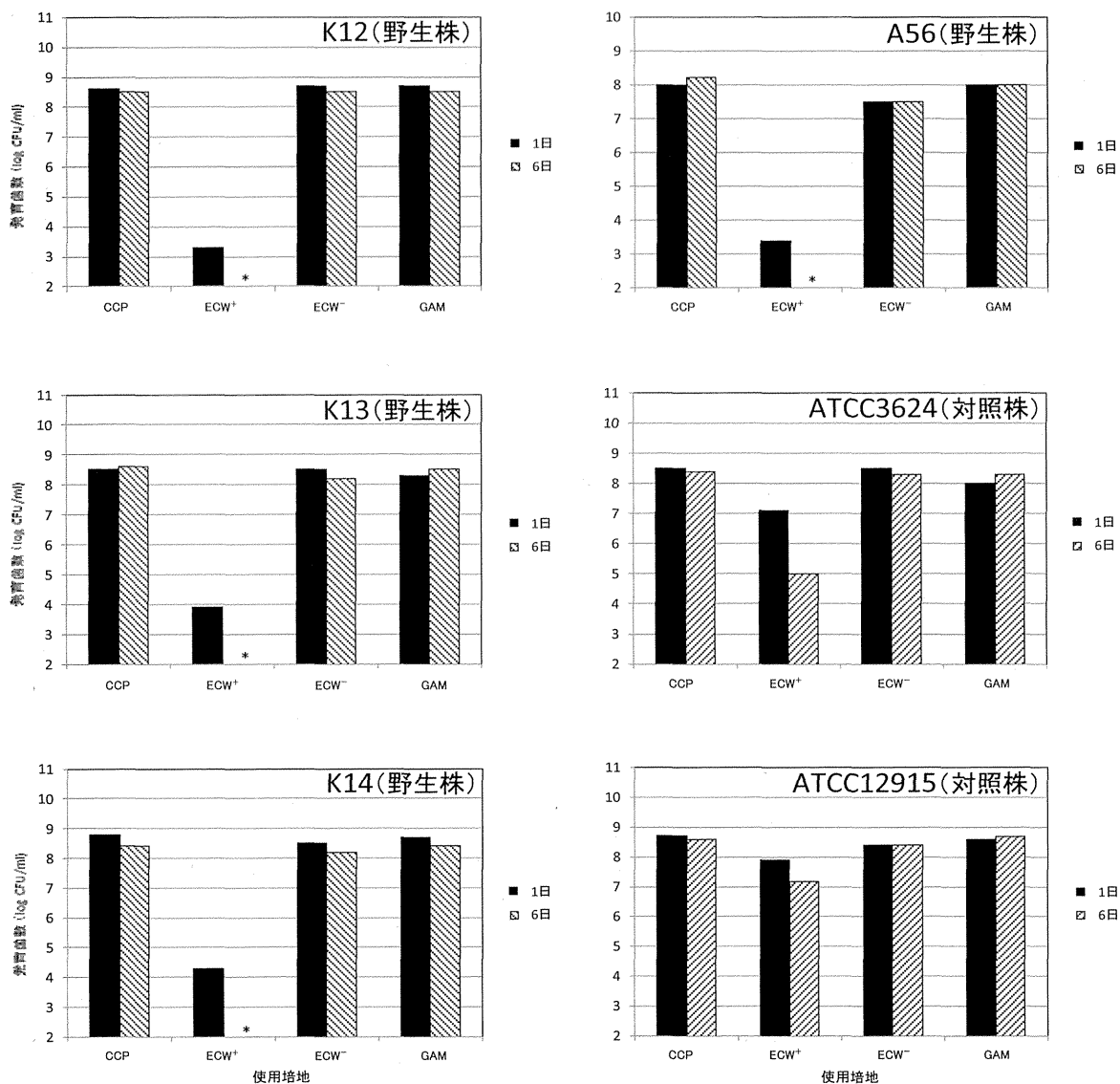


図3 カナマイシン含有卵黄加 CW 寒天培地で発育不良を呈するウェルシュ菌の
カナマイシンの有無による発育菌数及び培地作製後の経過日数毎の発育菌数

CCP : CHROMagar™ *C. perfringens* 試作品
 ECW⁺ : カナマイシン含有卵黄加 CW 寒天培地
 ECW⁻ : カナマイシン不含卵黄加 CW 寒天培地
 GAM : GAM 寒天培地
 * 出発希釈である 10⁻¹ 希釈菌液による試験において発育せず

分 担 研 究 報 告 書

食中毒事例等で分離された黄色ブドウ球菌の遺伝子型別について

齊藤 志保子

平成 26 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

食品中の食中毒菌等の遺伝特性及び制御に関する研究

研究代表者 大西 貴弘（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）

分担研究報告書

食中毒事例等で分離された黄色ブドウ球菌の遺伝子型別について

研究分担者	齊藤志保子	（秋田県健康環境センター）
研究協力者	小林昭彦	（さいたま市健康科学研究センター）
研究協力者	堀川和美	（福岡県保健環境研究所）
研究協力者	武沼浩子	（青森県環境保健センター）
研究協力者	岩渕香織	（岩手県環境保健研究センター）
研究協力者	小黒祐子	（福島県衛生研究所）
研究協力者	八柳 潤	（秋田県健康環境センター）
研究協力者	熊谷優子	（秋田県健康環境センター）
研究協力者	今野貴之	（秋田県健康環境センター）
研究協力者	高橋志保	（秋田県健康環境センター）
研究協力者	和田恵理子	（秋田県健康環境センター）
研究協力者	樫尾拓子	（秋田県健康環境センター）

各自治体が行う食中毒事例や食品等の食中毒菌のサーベイランスに活用できるタイピング方法を検討するため、食中毒事例等で分離された黄色ブドウ球菌について POT 法、MLVA 法、PFGE 法により遺伝子型別を実施した。また、ブドウ球菌エンテロトキシン（SE：Staphylococcal enterotoxin）遺伝子の保有状況について PCR 法により検討した。その結果、食中毒事例等 25 事例由来 75 株は POT 法で 31 種類、SE 型と POT 型の組み合わせで 35 種類、MLVA 法で 36 種類に型別された。さらに、POT 法と MLVA 法の型別の評価のため、POT 型 24 種（SE:POT 型 27 種）、MLVA 法 27 種に型別された 53 株について PFGE 型別を実施したところ、26 種類に型別された。同じ POT 型、MLVA 型が PFGE 法で細分化される例、逆に異なる POT 型、MLVA 型が同一の PFGE パターンとなる例もみられたが、POT 法と MLVA 法による型別は PFGE 法による型別とほぼ同程度の解析力を有していることが確認された。また、簡便性・迅速性からも POT 型別及び MLVA 型別は有用な型別法であると考えられた。

A. 研究目的

一般に流通している食品における各種食中毒菌の汚染状況及び菌株の型別等の疫学情報は食中毒発生時の原因究明あるいは食品衛生指導等に非常に有用と考えられる。食中毒菌のデータベース構築を目指し、食品検査あるいは食中毒事例において分離された黄色ブドウ球菌を対象に、各自治体において実施可能なタイピング方法について検討するため、昨年度は平成 24 年度に実施した鶏肉汚染実態調査で分離された黄色ブドウ球菌について POT 法、MLVA 法、PFGE 法により遺伝子型別を実施した。またブドウ球菌エンテロトキシンの保有状況について、現在各施設においてルーチンで実施されている A～E 型の *sea*～*see* 遺伝子検索に加えて新型エンテロトキシンの G, H, I 型の *seg*, *seh*, *sei* 遺伝子の保有状況について PCR 法により検討した⁴⁾。今年度は、さらに、実際の食中毒事例における応用の可能性を検討するため、黄色ブドウ球菌食中毒事例由来株、有症苦情事例や他の原因物質事例で検出された黄色ブドウ球菌について同様に検討した。

B. 研究方法

1. 供試菌株

供試した菌株が分離された事例一覧を表 1 に示す。以下特に記載がない場合、‘食中毒事例’は黄色ブドウ球菌食中毒を示し、‘有症苦情等事例’は有症苦情事例及び黄色ブドウ球菌以外の病因による食中毒事例

を表す。

平成 25 年度に供試した 2 事例由来 5 株を含めて、食中毒 14 事例由来 49 株、有症苦情等 11 事例由来 26 株、計 75 株の黄色ブドウ球菌についてブドウ球菌エンテロトキシン (SE) 遺伝子の保有状況を PCR 法により調査するとともに、POT 法、MLVA 法による遺伝子型別を実施した。また、これらの株から選択した 53 株を PFGE 法による遺伝子型別に供試した。さらに平成 25 年度に実施した市販鶏肉由来黄色ブドウ球菌の遺伝子型別結果と比較検討した。

2. ブドウ球菌エンテロトキシン (SE) 遺伝子の検出

ブドウ球菌エンテロトキシン A～E 型の遺伝子である *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see* に加え G 型, H 型, I 型の遺伝子である *seg*, *seh*, *sei* の保有について PCR 法により検索した。プライマー、各種条件等については Katsuhiko Omoe らの報告¹⁾に従った。

3. POT 法 (Phage ORF typing 法)

POT 法は菌株ごとに異なる ORF の保有パターンを Multiplex PCR によって検出する方法である。シカジーニアス DNA 抽出試薬を用いて新鮮培養菌を 70℃ 20 分, 94℃ 3 分処理によりテンプレートを作成し、黄色ブドウ球菌用シカジーニアス分子疫学解析 POT キット (関東化学株式会社) を用いて PCR を行った。ターゲットとする 22 領域の増幅バンドの有無から POT 型の数値に変換し、POT1-POT2-POT3

の3つの数値により型を標記した。

4. MLVA 法 (Multiple Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis)

MLVA 法は MRSA を型別対象とした Artur Sabat らの方法²⁾を一部改変し実施した。*clfA*, *clfB*, *sdr* (*sdrC*, *sdrD*, *sdrE*), *spa*, *ssp* の7カ所の遺伝子を対象として5種類のプライマーセットにより Multiplex PCR を行った。本法は株における VNTR の多様性をデジタル表示化するのではなく異なるバンドパターンを比較解析して型別するものであり、解析は Fingerprinting II を用いて N. Malachowa らの方法³⁾に従い類似係数 Dice、デンドログラムタイプ UPGMA により実施した。各パターンは任意に定めて MLVA 型 (ML26-数字) として示した。

5. PFGE 法

POT 法及び MLVA 法の型別結果を評価するため遺伝子型別の基準として PFGE を実施した。菌株を BHI で 30℃ 一夜培養後、遠心し、その沈さに CSB*1 (リゾチーム 5mg/ml、リゾスタフィン 0.2 µg/ml 加) 100 µl を加え、1% Seakem Gold Agarose/TE を等量混合し、プラグを作成した。プラグを CLB*2 (リゾチーム 5mg/ml、リゾスタフィン 0.2 µg/ml 加) 1ml 中 37℃ 2 時間処理後、プロテナー S K 処理を 50℃ 一夜行った。制限酵素には *Sma*I を用い、泳動条件は 6V/cm²、5.3 ~ 34.9 S 20 時間とした。解析は Fingerprinting II を用いて、類似係数

Jaccard、デンドログラムタイプ UPGMA により実施した。各パターンは任意に定めて PFGE 型 (PF26-数字) として示した。

*1 CSB : Cell suspension buffer

100mM Tris、100mM EDTA (pH 8.0)

*2 CLB : Cell Lysis buffer

50mM Tris、50mM EDTA (pH 8.0)

+ 1 % Sarcosyl

C. 研究結果

食中毒事例及び有症苦情事例等由来黄色ブドウ球菌株の各種型別結果一覧を表 2 に示した。

1. ブドウ球菌エンテロトキシン (SE) 遺伝子の保有状況

分離株における SE の A 型 ~ E 型及び G 型 ~ I 型の遺伝子 *sea*、*seb*、*sec*、*sed*、*see*、*seg*、*seh*、*sei* 保有状況について事例別集計を表 3 に示した。表中の分離株の SE 型の “/” は同一株から複数の型の SE 遺伝子が検出されたことを示し、例えば B/H は B 型 (*seb*) と H 型 (*seh*) の二つを同時に保有する株であったことを示す。また A, G/I 等の “,” は同じ事例から複数の異なる SE 型の株が分離されたことを示す。

A 型遺伝子 *sea* を単独・混合を含め食中毒事例由来株の 93.9% (46/49 株) が保有しており、14 事例中 13 事例に認められた。有症苦情等事例由来株では *sea* 保有率は 34.6% (9/26 株) であり、約半数の事例に認められた。

平成 25 年度に実施した鶏肉由来株の SE 型との比較について、SE 型別毎にその遺伝子を保有する株が分離された鶏肉検体数、食中毒事例数、有症苦情等事例数を表 4 に示した。同一検体・事例から異なる種類・組み合わせの SE 遺伝子保有株が分離された場合はそれぞれの SE 型の欄に 1 と重複記載した。なお黄色ブドウ球菌分離陽性鶏肉検体は 32 検体であり、異なる種類の SE 遺伝子を保有する株が同時に検出された検体はそのうち 7 検体であった。食中毒事例では従来のエンテロトキシン型の A～E 型の遺伝子を含む株が分離された事例が 88.9%、有症苦情等事例でも 66.7%であったが、鶏肉検体では 25.6%であった。新型 (G, H, I) 遺伝子のみ保有は鶏肉の 43.6%に比べて食中毒事例、有症苦情等事例はそれぞれ 11.1%、27.8%であった。鶏肉検体と食中毒事例や有症苦情等事例では分離株が保有する SE 遺伝子の傾向が異なった。

2. POT 法による型別

食中毒事例 14 事例由来 49 株は POT 法で 15 種類に型別された。有症苦情等 11 事例由来 26 株は POT 法で 18 種類に型別された。食中毒事例と有症苦情等事例の両方に 0-1-0 と 2-1-0 に型別された株があったことから、合わせて 25 事例由来 75 株は最終的に 31 種類の POT 型に型別された(図 1, 表 5)。同一事例由来株においては SE 型が同じであった株はほとんど POT 型も一致した(表 2)。同一事例中の同じ

SE 型株で POT 型の不一致は事例 A8、事例 B6 で認められ、事例 A8 では、SE A 型患者由来株の POT 型は 0-51-9 であったが、SE A 型従業員由来株は 2-59-47 と異なっていた。事例 B6 では SE B 型株が 0-8-80 と 0-16-48 の 2 種類に型別された。異なる事例由来株で POT 型が一致した例は 0-1-0 : 事例 A8 (A/B 型), A9 (A/B 型), B1 (A 型)、0-51-9 : 事例 A5 (A 型), A8 (A 型), A9 (A 型)、2-1-0 : 事例 A12 (A 型), A14 (A/H 型), B2 (A/C 型)、93-201-117 : 事例 B3 (G/I 型), B4 (G/I 型) で認められた。事例 A8 と A9 及び B3 と B4 はそれぞれ事例発生地域・時期が近い事例であり、POT 型と SE 型の組み合わせが同じ株が認められた。

3. MLVA 法による型別

食中毒事例及び有症苦情等事例由来株 75 株は MLVA 法で 36 種類に型別された。SE 型と POT 型別の組み合わせと比較してみると、表 6-1 に示すように 4 種類の SE 型 : POT 型 (B:0-8-80, A:0-51-9, G/I:6-50-1, A/G/I:6-170-112) がそれぞれ 2～3 種類の MLVA パターンに細分化され。一方、表 6-2 に示すように A:0-19-65 と A:0-51-73 が ML26-2 に、A:0-1-1 と A:0-115-25 が ML26-3 に、G/I:4-0-0 と A/G/I:4-137-80 が ML26-6 に、B:0-8-80 の一部と B:0-16-48 が ML25-30 に型別された。

4. PFGE による型別

食中毒事例及び有症苦情等事例由来株

53株はPFGE法で26種類に型別された(図2, 表7)。A:0-51-9:ML26-9型はPFGEでPF26-3, 10に細分化された。また、ML26-2はPF26-2, 3に、ML26-3はPF26-4, 11に、ML26-6はPF6, 12に、ML26-30はPF26-21, 22に細分化された(表6-2)。一方表6-3に示すようにML26-2, 4, 9がPF26-3に、ML26-7, 8がPF26-7に、ML26-3, 17がPF26-11に、ML26-20, 21がPF26-19に、ML26-29, 30がPF26-21に型別された。

5. 鶏肉由来株と食中毒事例由来株の遺伝子型別の比較

表8に食中毒等由来株と25年度に調査した鶏肉由来株のSE型とPOT型の組み合わせの一覧を示した。事例等由来株と鶏肉由来株でPOT型の一致が認められた型は0-1-0, 0-1-1, 0-9-16, 2-1-0, 4-0-0の5種であり、その内SE型とPOT型の組み合わせが一致したものはA:0-1-1, G/I:0-9-16, G/I:4-0-0の3種であった。この3種類に該当する株についてMLVAパターンを確認したところ、食中毒等由来株と鶏肉由来株では一致は認められなかった(図3)。同様にPFGEパターンを比較したところ食中毒等由来株と鶏肉由来株で一致がみられたのはA:0-1-1のみであった(図4)。

D. 考察

黄色ブドウ球菌のSE型について、鶏肉由来株がG/I型の遺伝子 *seg, sei* を高率

に保有していることを平成25年度に報告した。今回実施した食中毒事例由来株、有症苦情等事例由来株においても新型SE遺伝子保有株が確認されたが、鶏肉由来株に比較して *seg, sei* 遺伝子の保有率は低く、食中毒事例で顕著に低かった。食中毒事例ではむしろ、A型SE遺伝子保有株が関与する事例が多数を占め、従来型特にA型エンテロトキシン保有株の重要性が示された。このように食中毒事例と鶏肉由来株ではSE遺伝子保有状況はかなり異なっていた。

事例等由来株の遺伝子型別については、昨年度に引き続きMRSAの疫学解析用として用いられているPOT法とMLVA法を試行した。今回供試した株は全てMSSAであり、POT法では、対象とする22領域中の *mec* 遺伝子関連のバンドが(ー)となることから、解析に用いられるバンド数がMRSAと比較して少なかったが、検出されたバンドを数値化することによりPOT型別は可能であった。MLVA法についても、MRSAの場合は通常7本のバンドが検出されるが、ほとんどの供試株では4~6本のバンドの位置による解析で型別が可能であった。

事例由来75株はPOT法で31種、SE型とPOT型の組み合わせで35種、MLVA法で36種に型別された。同じSE:POT型がMLVA法で細分化された例、逆に異なるSE:POT型が同じMLVAに型別された例が一部みられたが、SE:POT型とMLVA型ほぼ同等に型

別され、SE と POT 型の組み合わせの型別は有効と考えられた。

POT 法と MLVA 法の型別の評価のため POT 型 24 種 (SE:POT 型 27 種)、MLVA 法 27 種に型別された 53 株について PFGE 型別を実施したところ、26 種類に型別された。同じ POT 型、MLVA 型が PFGE 法で細分化される例、逆に異なる POT 型、MLVA 型が同一の PFGE パターンとなる例もみられたが、POT 法と MLVA 法による型別は PFGE 法による型別とほぼ同等の解析力を有すると考えられた。

POT 法はキット化された 2 セットの Multiplex PCR 法であり、操作の簡便性、結果判定の迅速性に優れている。また、型別結果が数値により標記されることから、分離機関、地域、時期等が異なる分離株においても比較解析が容易である。MLVA 法については、今回実施した方法は PFGE 法と同様にバンドの位置による画像解析のため、他のデータとの比較は Fingerprinting II 等を用いた系統樹解析が必要となるが、プライマー 5 組 1 セットを使用する Multiplex PCR に基づいた方法であることから、迅速性に優れ、同一事例等の同時解析における菌株の比較においては有効に活用可能と考えられる。

POT 法と MLVA 法は鶏肉由来株と同様に食中毒事例由来株の解析にも応用可能であった。鶏肉由来株と事例由来株で一致した SE:POT 型は 3 種あり、MLVA 型別ではいずれも不一致であったが、PFGE 型別で

は鶏肉及び事例由来の A:0-1-0 株が一致し、これらの株は近縁と考えられた。鶏肉の黄色ブドウ球菌汚染は非常に高率であり、そのなかに数は少ないが食中毒事例由来株と近縁な株も認められ、鶏肉の黄色ブドウ球菌食中毒感染源としての可能性はさらに検討が必要と考えられた。

今後、食中毒事例由来株や各種食品由来株の遺伝子型別データを蓄積・比較解析することにより、健康被害に関与する株の SE 型と POT 型あるいは MLVA 型との組み合わせを推定できる可能性が考えられる。このような情報を関係機関が共有することは食中毒予防・迅速な原因食品究明に役立つと考えられる。

E. 結論

POT 法や MLVA 法による遺伝子型別は PFGE に匹敵する解析力を有し、操作の簡便性、結果判明の迅速性からも食中毒事例や食品等の黄色ブドウ球菌検査において有用な型別法と考えられた。

F. 参考文献

1. K. omoe et al., Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates., FEMS Microbiology Letters 246, p191-198 (2005)

2. Sabat et al., New Method Typing
Staphylococcus aureus Strains:
Multiple-Locus Variable-Number
Tandem Repeat Analysis of
Polymorphism and Genetic
Relationships of Clinical
Isolates., JCM,
Vol. 41, No. 4, p1801-1804 (2003)
3. N. Malachowa et al., Comparison of
Multiple-Locus Variable-Number
Tandem-Repeat Analysis with Pulsed
Field Gel Electrophoresis, *spa*
Typing and Multilocus Sequence
Typing for Clonal Characterization
of *Staphylococcus aureus*
Isolates., JCM,
Vol. 43, No. 7, p3095-3100 (2005)
4. 食品中の食中毒菌等の遺伝特性及び
制御に関する研究 平成 25 年度 総
括・分担研究報告書

G. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

なし

表1 事例の内容及び供試株数一覧

	No	事例No	発生年(月日)	発生場所	患者数	原因食品	原因施設	備考	供試株数			
									糞便・吐物	食品	拭取等	計
黄色ブドウ球菌食中毒事例	1	A1	2009年	福岡県	10	あんこもち	菓子製造業	H25供試	1	1	1	3
	2	A2	2003年	福岡県	12	仕出し弁当	飲食店(仕出し)			1	1	2
	3	A3	2004年	福岡県	2	不明	家庭(推定)		1	1		2
	4	A4	2006年	福岡県	13	うな丼	飲食店(仕出し)		1	1		2
	5	A5	2008年	福岡県	15	焼豚、餃子(推定)	飲食店(一般食堂)		1		1	2
	6	A6	平成24年2月	福島県	13	食品名不明	飲食店(寿司屋)	食中毒疑い	2			2
	7	A7	平成24年5月	福島県	7	ホッキ貝おにぎり(県外者からの差し入れ)	温泉施設		4	2		6
	8	A8	平成26年6月30日	青森市	4	仕出し料理(食品名不明)	飲食店(仕出し)		3	1		4
	9	A9	平成26年7月1日	青森県	5	おにぎり疑い	飲食店		4	1		5
	10	A10	平成26年9月11日	青森市	11	幕の内弁当	レストラン		11			11
	11	A11	平成20年8月3日	盛岡市	3	おにぎり	飲食店(食堂)		1	1		2
	12	A12	平成21年7月18日	岩手県	59	幕の内弁当	飲食店(食堂)		4		1	5
	13	A13	平成26年7月20日	長野県	451	弁当(三色丼)	飲食店(弁当、仕出し、そうざい)		2			2
	14	A14	平成24年4月	さいたま市	5	不明(賄い料理)	事業所		1			1
食中毒事例14事例									食中毒事例由来株数 計			
有症苦情・他の病因による事例	15	B1	2011年	福岡県	5	不明(自家製おにぎり?)	家庭内	有症苦情・H25供試	2			2
	16	B2	平成25年2月	秋田県	292	給食	学校	病因:ノロウイルス	5			5
	17	B3	平成25年3月	秋田県	19	会席料理	飲食店	病因:サボウイルス	4			4
	18	B4	平成25年4月	秋田県	不明	不明	不明	有症苦情	1			1
	19	B5	平成25年4月	秋田県	不明	不明	不明	有症苦情	1			1
	20	B6	平成22年10月	福島県	42	旅館提供の料理(食品名不明)	旅館	病因:ウェルシュ菌	4			4
	21	B7	平成25年1月	福島県	11	日帰りバスツアー中の飲食(食品名不明)	旅館、道の駅	有症苦情	1			1
	22	B8	平成25年3月	福島県	7	桜餅	菓子屋	病因:ノロウイルス	1			1
	23	B9	平成25年5月31日	岩手県	16	不明	不明	有症苦情	5			5
	24	B10	平成25年8月	さいたま市	不明	不明	不明	有症苦情	1			1
	25	B11	平成25年8月	さいたま市	不明	不明	不明	有症苦情	1			1
有症苦情等事例11事例									有症苦情等事例由来株数 計			
									事例等由来株数 合計			
									62	9	4	75

表2 平成26年度 食中毒事例・有症苦情事例等由来黄色ブドウ球菌株の検査結果一覧

	No	事例	由来	株No	SE型	POT型	MLVA	PFGE	H25年検査分
食中毒事例	1	A1	患者便	1	A	2 193 33	ML26-1	PF26-1	ML14, PF13
			従業員手指	2	A	2 193 33	ML26-1	PF26-1	ML14, PF13
			残食品(よもぎ)	3	A	2 193 33	ML26-1	PF26-1	ML14, PF13
	2	A2	食品(バラ寿司)	6	A	0 19 65	ML26-2	PF26-2	
			患者手指拭き取り	7	A	0 19 65	ML26-2	PF26-2	
	3	A3	食品(マグロ)	8	A	0 51 73	ML26-2	PF26-3	
			患者便	9	A	0 51 73	ML26-2	PF26-3	
	4	A4	食品(イカ天ぷら)	10	A	0 115 25	ML26-3	PF26-4	
			患者便	11	A	0 115 25	ML26-3	PF26-4	
	5	A5	拭き取り(チルド庫)	12	A	0 51 9	ML26-4	PF26-3	
			患者便	13	A	0 51 9	ML26-4	PF26-3	
	6	A6	患者便	14	A	2 17 1	ML26-5	PF26-5	
			患者便	15	G,I	4 0 0	ML26-6	PF26-6	
	7	A7	患者便	16	A,G,I	6 170 112	ML26-7	.	
			患者便	17	A,G,I	6 170 112	ML26-7	PF26-7	
			患者便	18	A,G,I	6 170 112	ML26-7	PF26-7	
			患者便	19	A,G,I	6 170 112	ML26-8	PF26-7	
			食品(ホッキ貝おにぎり)	20	A,G,I	6 170 112	ML26-7	PF26-7	
			食品(ホッキ貝おにぎり)	21	A,G,I	6 170 112	ML26-7	.	
	8	A8	患者便	22	A	0 51 9	ML26-9	PF26-3	
			患者便	23	A	0 51 9	ML26-9	PF26-3	
			食品(おにぎり)	24	A,B	0 1 0	ML26-10	PF26-8	
			従事者便	25	A	2 59 47	ML26-11	PF26-9	
	9	A9	患者便	26	A,B	0 1 0	ML26-10	PF26-8	
			患者便	27	A	0 51 9	ML26-9	PF26-3	
			患者便	28	A	0 51 9	ML26-9	PF26-10	
			患者便	29	A	0 51 9	ML26-9	.	
			食品	30	A	0 51 9	ML26-9	PF26-3	
	10	A10	患者便	31	A	0 1 1	ML26-3	PF26-11	
			患者便	32	A	0 1 1	ML26-3	PF26-11	
			患者便	33	A	0 1 1	ML26-3	.	
			患者便	34	A	0 1 1	ML26-3	.	
			患者便	35	A	0 1 1	ML26-3	.	
			患者便	36	A	0 1 1	ML26-3	.	
			患者便	37	A	0 1 1	ML26-3	.	
			患者便	38	A	0 1 1	ML26-3	.	
			患者便	39	A	0 1 1	ML26-3	.	
			患者便	40	A	0 1 1	ML26-3	.	
			患者便	41	A,G,I	4 137 80	ML26-6	PF26-12	
	11	A11	患者便	42	A	2 65 33	ML26-12	PF26-13	
			食品	43	A	2 65 33	ML26-12	PF26-13	
	12	A12	拭き取り	44	A	2 1 0	ML26-13	PF26-14	
			患者便	45	A	2 1 0	ML26-13	PF26-14	
			患者便	46	A	2 1 0	ML26-13	PF26-14	
			患者便	47	A	2 1 0	ML26-13	.	
			従事者便	48	A	2 1 0	ML26-13	PF26-14	
	13	A13	患者便	49	G,I	6 50 1	ML26-14	PF26-15	
			患者便	50	G,I	6 50 1	ML26-15	PF26-16	
	14	A14	患者便	51	A,H	2 1 0	ML26-16	PF26-17	
有症苦情・他の病因による食中毒事例	15	B1	患者便	4	A	0 1 0	ML26-17	PF26-11	ML03, PF03
			患者吐物	5	G,I	6 18 81	ML26-18	PF26-18	ML22, PF25
	16	B2	糞便	52	-	4 26 0	ML26-19	.	
			糞便	53	-	0 9 16	ML26-20	PF26-19	
			糞便	55	G,I	0 9 16	ML26-21	PF26-19	
			糞便	54	A,C	2 1 0	ML26-22	.	
			糞便	56	A	6 152 34	ML26-23	.	
	17	B3	糞便	57	D,G,I	4 11 32	ML26-24	.	
			糞便	58	A,G,I	6 186 42	ML26-25	.	
			糞便	59	G,I	93 201 117	ML26-26	PF26-20	
			糞便	60	G,I	93 201 117	ML26-26	PF26-20	
	18	B4	糞便	61	G,I	93 201 117	ML26-26	PF26-20	
	20	B6	糞便	62	H	106 55 37	ML26-27	.	
			糞便	63	B	0 8 80	ML26-28	.	
			糞便	64	B	0 8 80	ML26-29	PF26-21	
			糞便	66	B	0 8 80	ML26-30	PF26-21	
	23	B9	糞便	65	B	0 16 48	ML26-30	PF26-22	
			糞便	67	A,H	2 1 65	ML26-31	.	
			糞便	68	C,G,I	4 10 0	ML26-32	.	
			糞便	69	D	2 129 0	ML26-33	PF26-23	
	24	B10	糞便	73	D	2 129 0	ML26-33'	PF26-23	
			糞便	70	A,D	2 145 65	ML26-34	PF26-24	
			糞便	71	A,D	2 145 65	ML26-34	PF26-24	
			糞便	72	A,D	2 145 65	ML26-34	.	
	25	B11	糞便	74	B,G,I	0 25 82	ML26-35	PF26-25	
			糞便	75	A	2 9 18	ML26-36	PF26-26	

表3 事例別分離株のSE遺伝子保有状況(A～E型: *sea*～*see*, G～I型: *seg*～*sei*)

	No	事例No	分離株のSE型	<i>sea</i> 保有株	供試株数	
黄色ブドウ球菌食中毒事例	1	A1	A	3 / 3		A型SE株が分離された事例: 13事例
	2	A2	A	2 / 2		
	3	A3	A	2 / 2		
	4	A4	A	2 / 2		
	5	A5	A	2 / 2		
	6	A6	A, G/I	1 / 2		
	7	A7	A/G/I	6 / 6		
	8	A8	A, A/B	4 / 4		
	9	A9	A, A/B	5 / 5		
	10	A10	A, A/G/I	11 / 11		
	11	A11	A	2 / 2		
	12	A12	A	5 / 5		
	13	A13	G/I	0 / 2		
	14	A14	A/H	1 / 1		
				46 / 49 (93.9%)		
有症苦情・他の病因による事例	15	B1	A, G/I	1 / 2		A型SE株が分離された事例: 6事例
	16	B2	A, A/C, G/I	2 / 5		
	17	B3	A/G/I, D/G/I, G/I	1 / 4		
	18	B4	GI	0 / 1		
	19	B5	H	0 / 1		
	20	B6	B	0 / 4		A型SE株が分離されなかった事例: 5事例
	21	B7	A/H	1 / 1		
	22	B8	C/G/I	0 / 1		
	23	B9	A/D, D	3 / 5		
	24	B10	B/G/I	0 / 1		
	25	B11	A	1 / 1		
				9 / 26 (34.6%)		

表4 SE遺伝子保有株が分離された検体数及び事例数

	SE型	鶏肉検体数	食中毒事例数	有症苦情等事例数
従来型 A～E 型を含むパターン	A	2	11	3
	B	0	0	1
	D	0	0	1
	A/B	0	2	0
	A/C	0	0	1
	A/D	0	0	1
	A/H	0	1	1
	B/H	1	0	0
	A/B/H	6	0	0
	A/G/I	0	2	1
	B/G/I	0	0	1
	C/G/I	0	0	1
	D/G/I	0	0	1
	A/C/G/I	1	0	0
	小計	10 (25.6%)	16 (88.9%)	12 (66.7%)
新型	G/I	17	2	4
	H	0	0	1
	小計	17 (43.6%)	2 (11.1%)	5 (27.8%)
未保有		12 (30.8%)	0	1 (5.6%)
合計		39	18	18

* 同一検体・事例から異なる種類・組み合わせのSE遺伝子保有株が分離された場合はそれぞれのSE型の欄に1と重複記載した。

表5 事例由来株のSE型、POT型、MLVA型一覧

	事例No	SE型	POT型			MLVA型別
黄色ブドウ球菌食中毒事例	A01	A	2	193	33	ML26-01
	A02	A	0	19	65	ML26-02
	A03	A	0	51	73	ML26-02
	A04	A	0	115	25	ML26-03
	A05	A	0	51	9	ML26-04
	A06	A	2	17	1	ML26-05
	A06	G,I	4	0	0	ML26-06
	A07	A,G,I	6	170	112	ML26-07
	A07	A,G,I	6	170	112	ML26-08
	A08,9	A,B	0	1	0	ML26-10
	A08,9	A	2	59	47	ML26-11
	A08,9	A	0	51	9	ML26-09
	A10	A	0	1	1	ML26-03
	A10	A,G,I	4	137	80	ML26-06
	A11	A	2	65	33	ML26-12
	A12	A	2	1	0	ML26-13
A13	G,I	6	50	1	ML26-14	
A13	G,I	6	50	1	ML26-15	
A14	A,H	2	1	0	ML26-16	
	計	POT型15種類 POT+SE型16種				16種
有症苦情・他の病因による事例	B01	A	0	1	0	ML26-17
	B06	B	0	8	80	ML26-18
	B06	B	0	8	80	ML26-19
	B06	B	0	8	80	ML26-20
	B02	-	0	9	16	ML26-21
	B02	G,I	0	9	16	ML26-22
	B06	B	0	16	48	ML26-23
	B10	B,G,I	0	25	82	ML26-24
	B02	A,C	2	1	0	ML26-25
	B07	A,H	2	1	65	ML26-26
	B11	A	2	9	18	ML26-27
	B09	D	2	129	0	ML26-28
	B09	A,D	2	145	65	ML26-29
	B08	C,G,I	4	10	0	ML26-30
	B03	D,G,I	4	11	32	ML26-30
	B02	-	4	26	0	ML26-31
	B01	G,I	6	18	81	ML26-32
	B02	A	6	152	34	ML26-33
	B03	A,G,I	6	186	42	ML26-34
	B03,4	G,I	93	201	117	ML26-35
B05	H	106	55	37	ML26-36	
	計	POT型18種類 POT+SE型19種				20種
合計	POT型31種類 POT+SE型35種				36種	

表6-1 同一SE+POT型がMLVAとPFGEで細分化された株

事例No	SE	POT			MLVA	PFGE
B6	B	0	8	80	ML26-28	.
B6	B	0	8	80	ML26-29	PF26-21
B6	B	0	8	80	ML26-30	PF26-21
A5	A	0	51	9	ML26-04	PF26-03
A8,9	A	0	51	9	ML26-09	PF26-03
A9	A	0	51	9	ML26-09	PF26-10
A13	G,I	6	50	1	ML26-14	PF26-15
A13	G,I	6	50	1	ML26-15	PF26-16
A7	A,G,I	6	170	112	ML26-07	PF26-07
A7	A,G,I	6	170	112	ML26-08	PF26-07

表6-2 同一MLVA型がPOT型とPFGEで細分化された株

事例No	MLVA	SE	POT			PFGE
A2	ML26-02	A	0	19	65	PF26-02
A3	ML26-02	A	0	51	73	PF26-03
A10	ML26-03	A	0	1	1	PF26-11
A4	ML26-03	A	0	115	25	PF26-04
A6	ML26-06	G,I	4	0	0	PF26-06
A10	ML26-06	A,G,I	4	137	80	PF26-12
B6	ML26-30	B	0	8	80	PF26-21
B6	ML26-30	B	0	16	48	PF26-22
A8,9	ML26-09	A	0	51	9	PF26-03
A9	ML26-09	A	0	51	9	PF26-10

表6-3 同一PFGE型がSE+POT型とMLVAで細分化された

事例No	PFGE	SE	POT			MLVA
A3	PF26-03	A	0	51	73	ML26-02
A5	PF26-03	A	0	51	9	ML26-04
A8,9	PF26-03	A	0	51	9	ML26-09
A7	PF26-07	A,G,I	6	170	112	ML26-07
A7	PF26-07	A,G,I	6	170	112	ML26-08
A10	PF26-11	A	0	1	1	ML26-03
B1	PF26-11	A	0	1	0	ML26-17
B2	PF26-19	-	0	9	16	ML26-20
B2	PF26-19	G,I	0	9	16	ML26-21
B6	PF26-21	B	0	8	80	ML26-29
B6	PF26-21	B	0	8	80	ML26-30

表7 事例由来株のPFGE型別結果

事例 No	SE型	POT型			MLVA型別	PFGE型別
B1	A	0	1	0	ML26-17	PF26-11
A8,9	A,B	0	1	0	ML26-10	PF26-8
A10	A	0	1	1	ML26-3	PF26-11
B6	B	0	8	80	ML26-29	PF26-21
B6	B	0	8	80	ML26-30	PF26-21
B2	-	0	9	16	ML26-20	PF26-19
B2	G,I	0	9	16	ML26-21	PF26-19
B6	B	0	16	48	ML26-30	PF26-22
A2	A	0	19	65	ML26-2	PF26-2
B10	B,G,I	0	25	82	ML26-35	PF26-25
A5	A	0	51	9	ML26-4	PF26-3
A9	A	0	51	9	ML26-9	PF26-10
A8,9	A	0	51	9	ML26-9	PF26-3
A3	A	0	51	73	ML26-2	PF26-3
A4	A	0	115	25	ML26-3	PF26-4
A12	A	2	1	0	ML26-13	PF26-14
A14	A,H	2	1	0	ML26-16	PF26-17
B11	A	2	9	18	ML26-36	PF26-26
A6	A	2	17	1	ML26-5	PF26-5
A8,9	A	2	59	47	ML26-11	PF26-9
A11	A	2	65	33	ML26-12	PF26-13
B9	D	2	129	0	ML26-33	PF26-23
B9	A,D	2	145	65	ML26-34	PF26-24
A1	A	2	193	33	ML26-1	PF26-1
A6	G,I	4	0	0	ML26-6	PF26-6
A10	A,G,I	4	137	80	ML26-6	PF26-12
B1	G,I	6	18	81	ML26-18	PF26-18
A13	G,I	6	50	1	ML26-14	PF26-15
A13	G,I	6	50	1	ML26-15	PF26-16
A7	A,G,I	6	170	112	ML26-7	PF26-7
A7	A,G,I	6	170	112	ML26-8	PF26-7
B3,4	G,I	93	201	117	ML26-26	PF26-20
小計	POT型24種類、POT+SE型27種				27種	26種
B6	B	0	8	80	ML26-28	・
B2	A,C	2	1	0	ML26-22	・
B7	A,H	2	1	65	ML26-31	・
B8	C,G,I	4	10	0	ML26-32	・
B3	D,G,I	4	11	32	ML26-24	・
B2	-	4	26	0	ML26-19	・
B2	A	6	152	34	ML26-23	・
B3	A,G,I	6	186	42	ML26-25	・
B5	H	106	55	37	ML26-27	・
合計	POT型31種類、POT+SE型35種				36種	

* ”・” PFGE型別未実施

表8 鶏肉及び食中毒事例等から分離された株のSE型とPOT型組み合わせ及び分離された検体数・事例数

No	SE型	POT			鶏肉検 体数	分離事例数	
						食中毒	他
1	G,I	0	0	0	1		
2	A	0	1	0			1
3	A,B	0	1	0		2	
4	G,I	0	1	0	2		
5	A	0	1	1	1	1	
6	-	0	3	1	1		
7	B	0	8	80			1
8	G,I	0	9	16	1		1
9	-	0	9	16			1
10	B	0	16	48			1
11	A	0	19	65		1	
12	G,I	0	25	80	1		
13	B,G,I	0	25	82			1
14	-	0	27	80	2		
15	A	0	51	9		2	1
16	A	0	51	73		1	
17	A	0	113	17	1		
18	A	0	115	25		1	
19	A,B,H	2	1	0	5		
20	A,H	2	1	0		1	
21	A,C	2	1	0			1
22	A	2	1	0		1	
23	B/H	2	1	0	1		
24	A,H	2	1	65			1
25	A	2	9	18			1
26	A	2	17	1		1	
27	-	2	53	32	6		
28	A	2	59	47		1	
29	A	2	65	33		1	
30	D	2	129	0			1
31	A,D	2	145	65			1
32	A	2	193	33		1	
33	G,I	4	0	0	3	1	
34	G,I	4	8	80	1		
35	C,G,I	4	10	0			1
36	D,G,I	4	11	32			1
37	G,I	4	16	0	6		
38	G,I	4	18	16	3		
39	-	4	24	0	1		
40	-	4	26	0			1
41	-	4	82	97	1		
42	A,G,I	4	137	80		1	
43	-	6	0	64	1		
44	-	6	0	84	1		
45	G,I	6	18	81			1
46	-	6	50	1		1	
47	A,C	6	132	32	1		
48	A	6	152	34			1
49	A	6	170	112		1	
50	A	6	186	42			1
51	-	93	201	117			2
52	-	106	55	37			1
検体数・事例数(再掲含)計					40	18	21

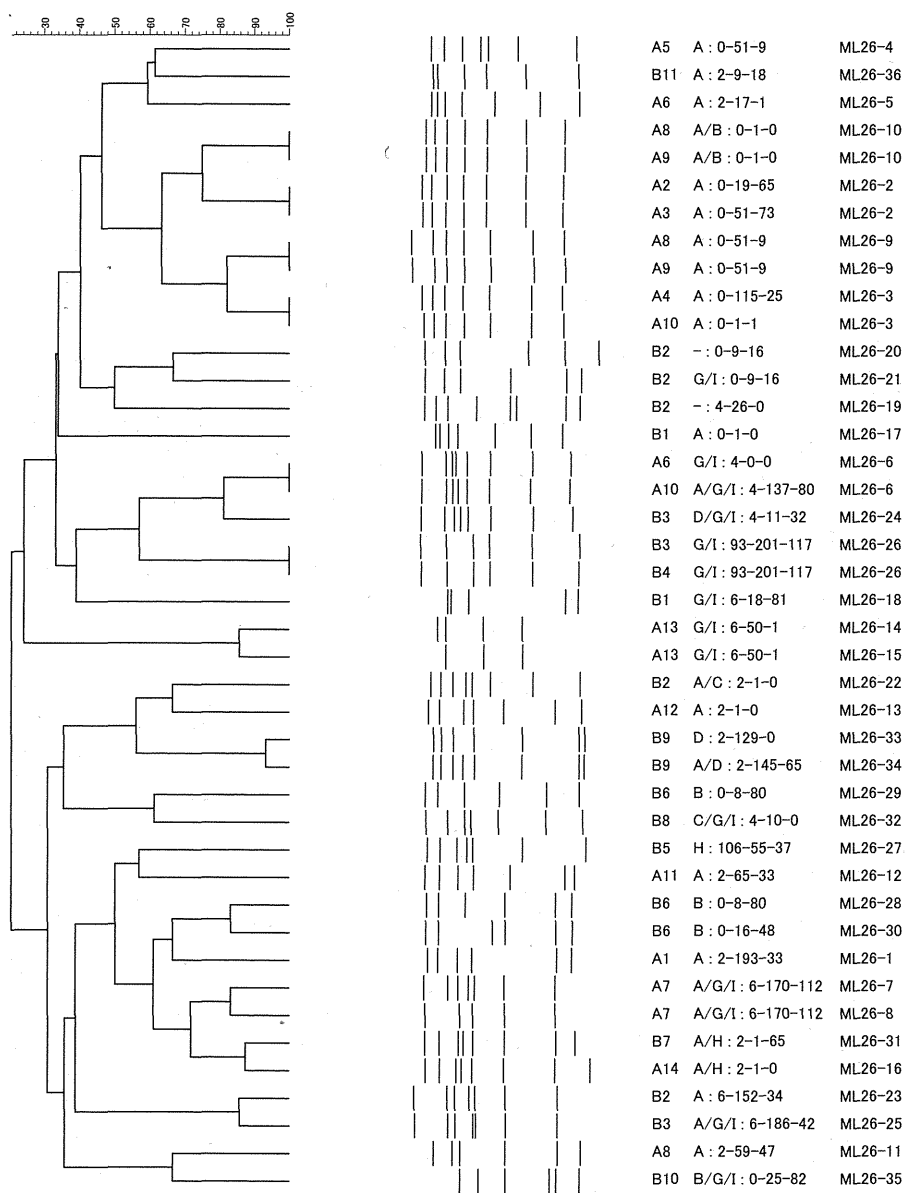


図1 事例等由来株の MLVA パターン系統樹

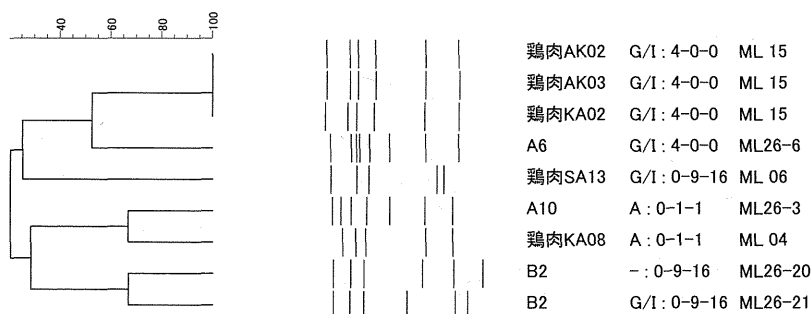


図3 鶏肉由来株 (H25) と事例由来株の SE 型 : POT 型一致株における MLVA パターンの比較

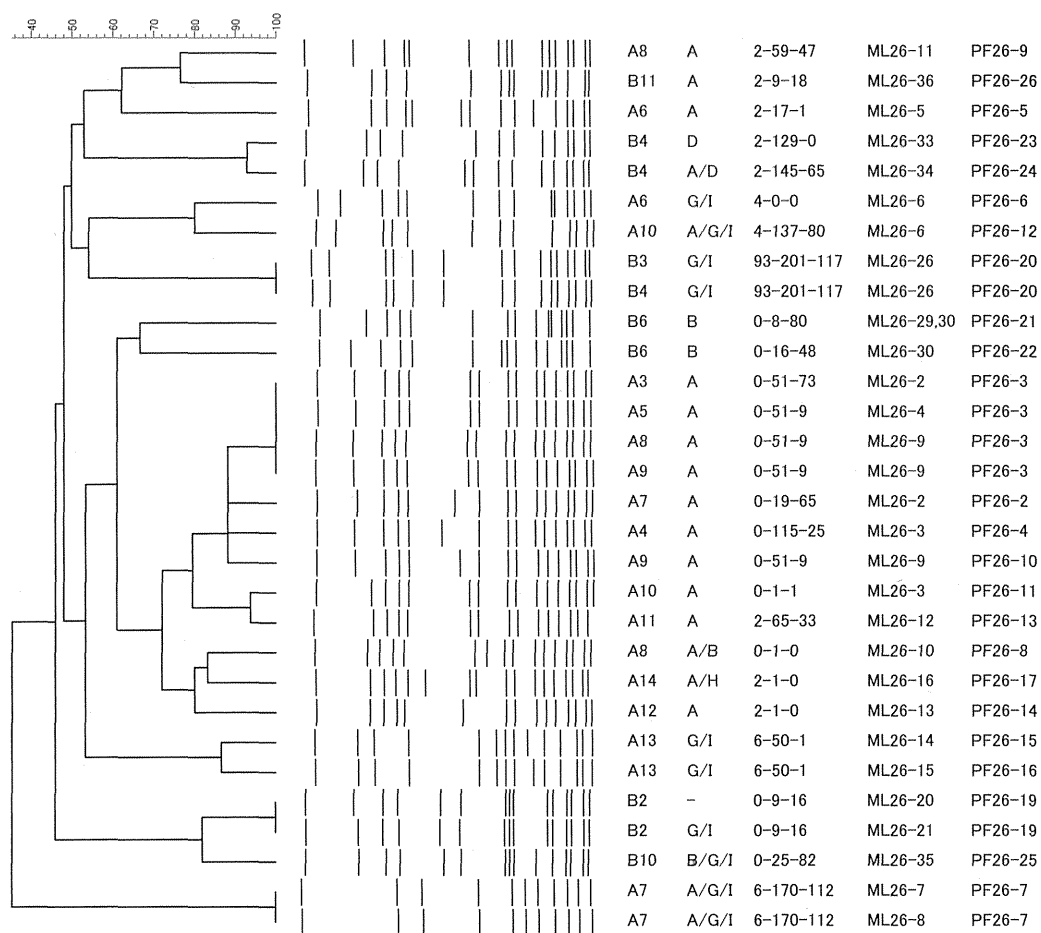


図2 事例由来株の PFGE パターン系統樹

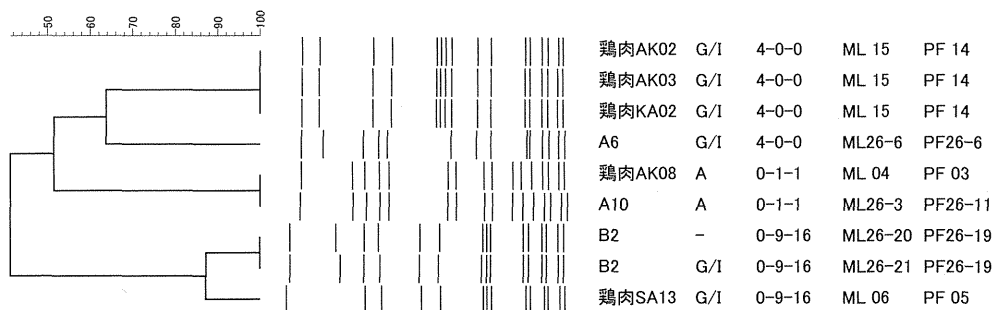


図4 鶏肉由来株 (H25) と事例由来株の SE 型 : POT 型一致株における
PFGE パターンの比較

分 担 研 究 報 告 書

Campylobacter jejuni の遺伝子型別法の評価

黒木 俊郎

分担研究報告書

Campylobacter jejuni の遺伝子型別法の評価

研究分担者 黒木俊郎（神奈川県衛生研究所 微生物部）

研究協力者 泉谷秀昌（国立感染症研究所 細菌第一部）

研究協力者 相川勝弘（神奈川県衛生研究所 微生物部）

研究協力者 古川一郎（神奈川県衛生研究所 微生物部）

Campylobacter jejuni の型別法として、パルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE 法）は広く普及しており、食中毒の発生時には原因物質の特定や感染経路の解明、食中毒の規模の把握等の疫学解析に用いられている。しかし、PFGE 法は操作が煩雑、結果を得るまでに 3～4 日を要する、複数の機関間での結果の比較が必ずしも容易ではないといった問題がある。カナダの研究者は、PCR 法を用いた新たな型別法である comparative genomic fingerprinting 40 (CGF40)を開発した。この CGF40 の国内での導入を目指し、評価を行った。今年度は、*C. jejuni* の標準株を用いて PCR 条件の設定の検討を行った。さらに、*C. jejuni* の分離株を CGF40 により型別を行い、PFGE 法との比較を行った。

A. 研究目的

Campylobacter jejuni による細菌性食中毒の発生時には、原因物質の特定や食中毒の規模の把握等の疫学調査が実施される。疫学マーカーとして、血清型別、パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）法、Amplified fragment length polymorphism (AFLP) 法等が利用されている。このうち、識別能の高さなどの理由から PFGE 法が最も普及している。しかし、PFGE 法には結果を得るまでに 3～4 日を要するため、迅速に結果を得ることができない、フラグメント解析

法であるために複数の機関が実施した解析結果を比較することが必ずしも容易ではないといった課題がある。

本研究では、カナダの研究者が開発した、PCR 法を用いる型別法：comparative genomic fingerprinting 40 (CGF40)（文献 1, 2）の国内への導入を目的として、CGF40 の操作法の検討ならびに評価を行った。

B. 研究方法

1) 菌株

CGF40 に用いる PCR 法の条件設定

の検討には、CGF40 の解析結果が既知の標準株 NCTC11168 (ATCC 700819) および RM 1221 (ATCC BAA-1062) を用いた (文献 1)。 *C. jejuni* および *C. coli* 分離株の CGF40 による解析には、平成 24 年度に「食品中の有害衛生微生物を対象としたライブラリーシステム等の構築」(主任研究者 小西良子) において、市販鶏肉からの分離した株 *C. jejuni* 74 菌株および *C. coli* 8 菌株を用いた。

2) CGF40 の PCR 法の条件の検討

CGF40 の条件は、既報を参照した (文献 1, 2)。CGF40 の原法では、対象とする 40 の遺伝子を 5 つずつの 8 セットに分け、各 5 つの対象遺伝子は multiplex PCR により同時に検出する。今回の検討では、taq polymerase の選択、マルチプレックスあるいはシングルでの PCR 反応の実施、および PCR での伸長反応とアニーリングの温度および時間の設定を行った。PCR 法の条件を表 1 に示した。Taq polymerase は Ex Taq Hot Start Version (タカラバイオ)、EmeraldAmp PCR Master Mix (タカラバイオ) および Multiplex PCR Assay Kit (タカラバイオ) を用いた。サーマルサイクラーは GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) を用いた。PCR 反応後に 3.0 % NuSieve™ 3:1 アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドにて染色後、紫外線下で観察した。

3) PFGE は CDC の方法に従い、制限酵素として *Sma*I を用い、鶏肉分離菌株について解析した。

4) 結果の解析

CGF40 および PFGE で得られた結果は、BioNumerics (Applied Maths) を用いて Pearson の相関係数で類似度を算出し、UPGMA によりクラスター解析を行った。

C. 研究結果

CGF40 による型別結果が公表されている標準株 2 株を用いて、表 1 に示した PCR 条件を設定し、それぞれの条件での結果の検討を行った。NCTC11168 を対象にして Ex Taq Hot Start Version を用いた条件 1~4 では、条件 1 では 10 本のバンドが得られなかったが、シングル PCR で実施した条件 2 では得られなかったバンドが 3 本に減少した。さらに、アニーリングと伸長の時間を 60 秒にした条件 3 でも 3 本のバンドが得られなかった。シングル PCR で実施した条件 4 でも 2 本のバンドが得られなかった。NCTC11168 を対象にして Multiplex PCR Assay Kit を用い、マルチプレックス PCR で実施した条件 5 では、7 本のバンドが得られなかった。NCTC11168 を対象にして EmeraldAmp PCR Master Mix を用いてマルチプレックス PCR で実施した条件 6 では、2 本のバンドが得られなかったが、シングル PCR ではバンドを得ることができた (表 2)。

RM1221 を対象にした場合は、条件

1 では 2 本のバンドが得られなかったが、条件 2 では 1 本のバンドが得られなかった。条件 3 および 4 では、RM1221 の公表された結果と一致した。条件 5 では 2 本のバンドが得られなかったが、条件 6 および 7 では RM1221 の公表された結果と一致した（表 2）。

以上の結果から、CGF40 の PCR 条件の設定の検討において、PCR 反応液として EmeraldAmp PCR Master Mix を用い、PCR 反応の温度および時間の設定を 94℃, 5 分→(94℃, 30 秒→55℃, 60 秒→72℃, 60 秒) x35 サイクル→72℃, 5 分に設定した場合に最も良い結果が得られた。PCR 反応条件について、原法の温度と時間の設定では基準株である NCTC11168 および RM1221 の結果において、検出できないバンドがみられたが、アニーリングと伸長反応を原法の 30 秒に対してそれぞれ 60 秒とした条件により結果に改善がみられた。

市販鶏肉から分離された *Campylobacter* について CGF40 を実施した結果、*C. jejuni* 74 菌株は 49 パターン、*C. coli* 8 菌株は 5 パターンに分けられた。これに対し PFGE では、*C. jejuni* は 59 パターン、*C. coli* は 6 パターンに分けられた。CGF40 において同一パターンとなった *C. jejuni* および *C. coli* の菌株のグループは 13 グループ認められ、このうち 7 つのグループでは PFGE パターンが異なる菌株が含まれていた（図 1）。さらに、PFGE による解析から同一パターンとなった菌株のグ

ループも 13 グループ認められ、このうち異なる CGF40 パターンが含まれる菌株のグループは 3 グループであった（図 2）。

CGF40 は *C. jejuni* の識別に開発された方法であるが、*C. coli* 8 菌株を識別することができる結果が得られたことから、本法は食中毒菌に指定される *C. jejuni* および *C. coli* の 2 菌種について解析が可能と思われた。今後、株数を増やして検討する必要がある。

D. 考察

昨年度の報告書で述べたように、*Campylobacter* の型別法には、血清型別や薬剤耐性パターンによる型別があり、さらに遺伝学的手法を用いた型別法として PFGE 法、RFLP 法、リボタイピング、AFLP 法、RAPD 法、MLST 法、*fla* typing 法、SNP 解析法が開発され、利用されている。保健所や地方衛生研究所等で実施される食中毒の疫学調査では、操作性や簡易性等の理由から PFGE 法が最も多用されている。PFGE 法には多くの利点があるが、結果を得るのに 3～4 日を要することや、フラグメント解析法であるために複数の機関での結果の比較に限界があるといった課題もある。そこで、より短時間で結果が得られ、複数の機関間での結果の比較を容易に行うことが可能な解析法として、CGF40 の評価を行った。

昨年度の検討結果から、PCR 法に用いる taq polymerase により PCR の結果が異なることが明らかとなっ